

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 A61K 31/70	A1	(11) 国際公開番号 WO 91/02530 (43) 国際公開日 1991年3月7日 (07. 03. 1991)
(21) 国際出願番号 PCT/JP90/01066 (22) 国際出願日 1990年8月22日 (22. 08. 90) (30) 優先権データ 特願平1/220031 1989年8月25日 (25. 08. 89) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サンスター株式会社 (SUNSTAR KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒569 大阪府高槻市朝日町3番1号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 松田尚樹 (MATSUDA, Naoki) [JP/JP] 〒658 兵庫県神戸市東灘区住吉本町3-7-46-106 Hyogo, (JP) 山崎恭子 (YAMAZAKI, Kyoko) [JP/JP] 〒569 大阪府高槻市上土室2-10-1 Osaka, (JP) 松浦昌宏 (MATSUURA, Masahiro) [JP/JP] 〒665 兵庫県宝塚市高司3-1-1 Hyogo, (JP) (74) 代理人 弁理士 青山 葆, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号 ツイン21 MIDタワー内 Osaka, (JP)	(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: ACCELERATOR FOR PERIODONTAL TISSUE REGENERATION (54) 発明の名称 歯周組織再生促進剤 (57) Abstract An accelerator for periodontal tissue regeneration comprising as the active ingredient an N-acetylated amino sugar selected from the group consisting of N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-mannosamine, and oligosaccharides comprising the above amines linked α -1,4 or β -1,4.		

(57) 要約

N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-D-ガラクト
 サミン、N-アセチル-D-マンノサミンおよびこれらが α -また
 は β -1,4-結合したオリゴ糖からなる群から選ばれるN-アセ
 チル化アミノ糖を活性成分として含有することを特徴とする歯周組
 織再生促進剤。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	ES スペイン	MG マダガスカル
AU オーストラリア	FI フィンランド	ML マリ
BB バルバドス	FR フランス	MR モーリタニア
BE ベルギー	GA ガボン	MW マラウイ
BF ブルキナ・ファソ	GB イギリス	NL オランダ
BG ブルガリア	GR ギリシャ	NO ノルウェー
BJ ベナン	HU ハンガリー	PL ポーランド
BR ブラジル	IT イタリア	RO ルーマニア
CA カナダ	JP 日本	SD スーダン
CF 中央アフリカ共和国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SE スウェーデン
CG コンゴ	KR 大韓民国	SN セネガル
CH スイス	LI リヒテンシュタイン	SU ソビエト連邦
CM カメルーン	LK スリランカ	TD チャード
DE 西ドイツ	LU ルクセンブルグ	TG トーゴ
DK デンマーク	MC モナコ	US 米国

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 1 -

明 細 書

歯周組織再生促進剤

発明の分野

本発明は、歯周炎により破壊された歯根膜を再生し、正常な歯根と結合組織間の付着を促進するために用いる薬剤に関する。

従来技術

従来、歯周炎の治療方法としては、主としてスクレーリング等による機械的な歯周ポケット内のプラーク除去が行なわれ、また重篤な場合には歯周外科的処置が行なわれ、加えて最近では抗生物質による化学療法も試みられている。しかし、これらの療法は、歯周炎の進行を阻止するには有効な方策であるが、破壊された歯周組織を積極的に修復、再生させるものではなく、臨床症状の改善はあくまで生体の自己治癒力によるものである。

歯周組織は硬組織(歯根)と軟組織(歯肉)とが歯根膜を介した線維性の強固な結合により付着するという、他の組織に見られない構造

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 2 -

を有しているが、歯周炎により歯周組織が破壊されると、歯根膜が再生する前に歯肉表面の上皮細胞が破壊部分を被覆してしまう(上皮のダウングロース)ために、上皮組織と歯根との緩い結合しか生じない。このため歯周組織の修復、再生が遅延し、歯肉の退縮が高頻度に生じる。これに対し、正常な線維性結合を達成するために、従来から、(1)クエン酸による根面処理(2)細胞付着性糖タンパクであるフィブロネクチンの局所への適用(3)生体適合性の高い遮断膜により上皮のダウングロースを抑制する誘導組織再生法(GTR法)が知られているが、(1)は細胞に対する為害性、(2)は高分子であるフィブロネクチンの安定性、抗原性、(3)は摘出のための再手術の必要性および術者による差といった問題点を抱えており、安全性、剤型化の容易性、有効性を兼ね備えた歯周組織再生を促進する薬剤の開発が望まれている。

発明の目的

本発明は、前記安全性、安定性および有効性に優れた歯周組織再

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 3 -

生剤を提供することを目的とする。

発明の概要

本発明は、N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミン、N-アセチル-D-マンノサミンおよびこれらのアミノ糖が α -または β -1,4結合したオリゴ糖からなる群から選ばれるN-アセチル化アミノ糖を活性成分として含有することを特徴とする歯周組織再生剤を提供するものである。

これらのN-アセチル化アミノ糖は特公昭58-11927号において、本出願人が歯垢の歯牙への付着抑制口腔用組成物の有効成分として開示しているが、歯周炎の治療においてこれを応用した報告はない。ところが、意外にも、本発明者らは、これらのN-アセチル化アミノ糖が歯周組織再生促進効果を有し、歯周炎の治療に有用であることを見出した。

発明の詳細な説明

本発明で活性成分として用いるN-アセチル-D-グルコサミン

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 4 -

は昆虫や甲殻類の殻の多糖であるキチンの主成分、N-アセチル-D-ガラクトサミンはコンドロイチン硫酸の主成分であり、N-アセチル-D-マンノサミンとともに自然界に存在する。また、N-アセチル-D-グルコサミンオリゴマーはキチンを加水分解し、中和、脱塩の後、ゲル濾過法によって単離精製される。N-アセチル-D-ガラクトサミンオリゴマーはD-ガラクトサミンが主に α -1,4結合した α -1,4ポリガラクトサミンを加水分解、アセチル化後、ゲル濾過法によって単離精製される。

これらの物質は生体由来物質であり非常に安全性が高く、例えば培養したヒト歯根膜細胞に対する細胞毒性は $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であり、有効性の観察される $10 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ では増殖阻害は全く見られない。

かくして、本発明の歯周組織再生促進剤は、通常の製剤技術に従って、有効かつ非毒性量の該N-アセチル化アミノ糖を医薬上許容される担体、例えば溶剤、等張化剤、乳化剤、懸濁剤、安定化剤と合

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 5 -

して外用剤(例えば、液剤、乳液、ゲル剤)とすることができる。かかる本発明の歯周組織再生促進剤は歯周外科処置、あるいは根面滑沢処理後の歯根面および剥離歯肉面に直接投与することにより使用できる。投与量は治療すべき症状、部位により適宜増減できるが、通常、該N-アセチル化アミノ糖を $10 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($0.001 \sim 0.01\%$)の濃度で1回 $0.1 \sim 0.3 \text{ ml}$ 程度、1日1～3回患部に塗布、あるいは注入により適用すると、所望の歯周組織再生促進効果が発揮される。

つぎに実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。

実施例 1

成分	量
N-アセチル-D-マンノサミン	0.002g
(シグマ社製)	
生理食塩水	全量100gに調整

これらの成分を混合溶解し、無菌濾過して液剤を得る。

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 6 -

実施例 2

成分	量
N-アセチル-D-ガラクトサミノ	0.01g
ダイマー(フナコシ薬品)	
ステアリン酸	2g
セタノール	0.5g
ラノリン	2g
イソプロピルミリステート	2g
スクワラン	3g
流動パラフィン	8g
ポリオキシエチレンセチルエーテル	1.7g
トリエタノールアミン	1g
グリセリン	4g
防腐剤	適量
精製水	全量100gに調整

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 7 -

これらの成分を用い、常法に従って乳液を得る。

実施例 3

成分	量
N-アセチル-D-グルコサミノトライマー	0.01g
ラウリル硫酸ナトリウム	0.2g
カルボキシメチルセルロース	2g
グリセリン	40g
精製水	全量100gに調整

これらの成分を混合し、ゲル剤を得る。

N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミン、N-アセチル-D-マンノサミンおよびこれらのアミノ糖が α -または β -1,4結合によるオリゴ糖の歯周組織再生促進作用を試験した。以下にその結果を示す。

() 歯根膜線維芽細胞の運動性に対する作用

ヒト抜去歯に残存する歯根膜より歯根膜線維芽細胞を、歯肉組織

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 8 -

より上皮細胞を初代培養し、各種N-アセチル化アミノ糖およびオリゴ糖を有する歯根膜線維芽細胞および歯肉上皮細胞への走化活性を、孔径8ミクロンのフィルターを用いた48穴マイクロチャンパー法により測定した。

5.0×10^5 個/ μ lの細胞懸濁液をチャンパーの上室に、下室には各種のN-アセチル化アミノ糖およびオリゴ糖を10～100 μ g/ μ lの割合で加え、37℃で4時間インキュベートした。ついでフィルターを固定し、ディフクイック(Diff-Quick)染色後、フィルターの底部まで遊走した細胞数を顕微鏡下で計数した。対照として、検体を加えずに同様に試験を行なった。対照の係数値を100%とした場合のN-アセチル化アミノ糖およびオリゴ糖添加時の相対的割合を第1表に示す。

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 9 -

第 1 表

検体	濃 度	歯根膜線 維芽細胞	歯肉上 皮細胞
対 照		100	100
N-アセチル-D- グルコサミン	10 μ g/ml 100 μ g/ml	114 135	101 97
N-アセチル-D- ガラクトサミン	10 μ g/ml 100 μ g/ml	131 168	106 107
N-アセチル-D- マンノサミン	10 μ g/ml 100 μ g/ml	145 176	91 95
N-アセチル-D- グルコサミノダイマー	10 μ g/ml 100 μ g/ml	110 128	100 101
N-アセチル-D- グルコサミノトライマー	10 μ g/ml 100 μ g/ml	140 145	110 99
N-アセチル-D- ガラクトサミノダイマー	10 μ g/ml 100 μ g/ml	131 160	97 102
N-アセチル-D- ガラクトサミノトライマー	10 μ g/ml 100 μ g/ml	145 161	113 110

第 1 表に示すごとく、N-アセチル-D-グルコサミンとそのダイマー、トライマー、N-アセチル-D-ガラクトサミンとそのダイマー、トライマー、さらにN-アセチル-D-マンノサミンは、

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 10 -

いずれもが歯根膜線維芽細胞に対する特異的な走化性活性を有し、
歯肉上皮細胞にはほとんど作用しなかった。この結果、明らかに、
これらの薬剤は歯周組織再生の中心となる歯根膜線維芽細胞のみを
より選択的に病変部位に遊走せしめる作用を有する。

(2) 歯根膜線維芽細胞の増殖性に対する作用

各種 N-アセチル化アミノ糖およびオリゴ糖の歯根膜線維芽細胞
の増殖性に対する作用を測定した。

直径 3.5 mm の組織培養用シャーレに歯根膜線維芽組織 3.0×10^4 個を播種し、37℃で1日インキュベート後、各種 N-アセチル化アミノ糖およびオリゴ糖を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の割合で加え、さらに37℃で2日インキュベートした。ついで細胞を0.15%トリプシン溶液でシャーレより剥離し、細胞数を血球計算盤により計測した。対照として、検体を加えずに同様に試験を行なった。

各検体においてシャーレ中で増殖した細胞数を第2表に示す。

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 11 -

第 2 表

検 体	細胞数／シャーレ
対 照	1.1×10^4
N-アセチル-D-グルコサミン	1.3×10^4
N-アセチル-D-ガラクトサミン	1.6×10^4
N-アセチル-D-マンノサミン	1.8×10^4
N-アセチル-D-グルコサミノ ダイマー	1.2×10^4
N-アセチル-D-グルコサミノ トライマー	1.2×10^4
N-アセチル-D-ガラクトサミノ ダイマー	1.7×10^4
N-アセチル-D-ガラクトサミノ トライマー	1.9×10^4

第 2 表に示すごとく、N-アセチル-D-グルコサミンとそのダ

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 12 -

イマー、トライマー、N-アセチル-D-ガラクトサミンとそのダイマー、トライマー、さらにN-アセチル-D-マンノサミンは、いずれもが歯根膜線維芽細胞の増殖性を高めた。

(3) イヌ歯肉剥離掻爬手術後の歯周組織再生過程に対する作用

イヌ歯肉剥離掻爬手術後の歯周組織再生過程に対する各種N-アセチル化アミノ糖およびオリゴ糖の作用を病理組織学的定量評価法により検討した。ブラッシング等により健常な歯周組織を確立した上下顎小臼歯部に、常法に従って歯肉剥離掻爬手術を施した。この際、後の病理組織学的定量化の基準点とするため、歯槽骨の削除を実施する前後で、根面にノッチと呼ばれる基準点を付与した。検体は実施例3で示したと同様なゲル剤とし、左側上下顎の露出した根面上に1部位当り50 μ gを投与し、対照として右側上下顎には薬物を配合しないゲル剤を投与した。手術後は歯肉弁を復位し、縫合とバックによる保護を1週間施した。評価は術後4週目に被検部位を採取し、常法により組織標本を作成した後、顕微鏡下で接眼マイク

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 13 -

ロメーターを用いて各部位間の距離を測定し、以下の基準で定量化した。

1: 上皮のダウングロス率(%)

$$\frac{\text{骨削除前のノッチ下縁から上皮の最根尖側までの距離}}{\text{骨削除の長さ}} \times 100$$

2: 線維性付着率(%)

$$\frac{\text{線維が垂直および斜走する部分の長さ}}{\text{骨削除の長さ}} \times 100$$

結果を第3表に示す。

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 14 -

第 3 表

検体	濃度 (%)	上皮のダウン グロース率	線維性 付着率
対照		12.6	23.1
N-アセチル-D- ガラクトサミン	0.01	11.8	35.2
N-アセチル-D- マンノサミン	0.01	10.7	40.3
N-アセチル-D- グルコサミノトライマー	0.01	10.4	37.8
N-アセチル-D-ガラ クトサミノトライマー	0.01	10.2	41.1

第 3 表に示すごとく、N-アセチル-D-ガラクトサミンとその
トライマー、N-アセチル-D-マンノサミン、さらにN-アセチ
ル-D-グルコサミノトライマーは、上皮のダウングロースをわず
かに抑制するとともに、線維性付着率に対しては明らかに促進作用
を示した。

以上の結果から明らかなごとく、N-アセチル化アミノ糖および
オリゴ糖はすぐれた歯周組織再生促進作用を有する。

WO 91/02530

PCT/JP90/01066

- 15 -

請求の範囲

1. N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミン、N-アセチル-D-マンノサミンおよびこれらが α -または β -1,4-結合したオリゴ糖からなる群から選ばれるN-アセチル化アミノ糖を活性成分として含有することを特徴とする歯周組織再生促進剤。
2. 該N-アセチル化アミノ糖を0.001~0.01%含有する請求項1記載の歯周組織再生促進剤。
3. 外用剤である請求項1記載の歯周組織再生促進剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP90/01066

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl ⁵	A61K31/70	
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	A61K31/70, C07H5/00-06, A61K7/16, 7/22-24	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	JP, A, 60-142923 (Lion Corp.), 29 July 1985 (29. 07. 85), Examples of chitin oligomer (polymerization degree average: 5) are described on the table 1, page 1 and other parts. (Family: none)	1 - 3
A	JP, A, 62-294607 (Kanebo, Ltd. and another), 22 December 1987 (22. 12. 87), (Family: none)	1 - 3
A	JP, A, 55-69506 (Sun Star Dentifrice Co., Ltd.), 26 May 1980 (26. 05. 80) & JP, B, 58-11927, (Family: none)	1 - 3
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
November 13, 1990 (13. 11. 90)		November 26, 1990 (26. 11. 90)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 90/ 01066

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. A 61 K 31 / 70		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	A 61 K 31 / 70, C 07 H 5 / 00 - 06, A 61 K 7 / 16, 7 / 22 - 24	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X	JP, A, 60-142923 (ライオン株式会社), 29. 7月. 1985 (29. 07. 85), 明細書 5 頁の第 1 表他にキチンオリゴマー (平均重合度 5) の例が示されている。(ファミリーなし)	1-3
A	JP, A, 62-294607 (鐘紡株式会社 他 1 名), 22. 12月. 1987 (22. 12. 87), (ファミリーなし)	1-3
A	JP, A, 55-69506 (サンスター歯磨株式会社), 26. 5月. 1980 (26. 05. 80) & JP, B, 58-11927, (ファミリーなし)	1-3
<p>※ 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
13. 11. 90	26. 11. 90	
国際調査機関	権限のある職員	4 C 7 8 2 2
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官 横 尾 俊 一	④